ISSN 0554-2111 (Impreso) ISSN 2244-8888 (En línea)

Pittieria
40
2016 ENERO-DICIEMBRE
pp. 164—173

EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE CAOBA (*Swietenia macrophylla* KING)

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON MAHOGANY (*Swietenia macrophylla* KING) *IN VITRO* MORPHOGENESIS

por

GLENDY MARTURET, BÁRBARA REGALES

Centro de Investigación en Biotecnología Agrícola (CIBA-UCV).

ROSALÍA VELÁSQUEZ-SALAZAR y CARMEN BETANCOURT

Instituto de Genética, Facultad de Agronomía UCV.

rvelasquezsalazar@gmail.com

RECIBIDO: noviembre 23 de 2015 / **ACEPTADO:** junio 23 de 2016

RESUMEN

La caoba es una especie forestal muy cotizada por su madera; amenazada por las deforestaciones indiscriminadas, el ataque severo de *Hypsipyla grandella* Zell y la baja viabilidad de la semilla. Por ello se planteó el establecimiento de un protocolo de morfogénesis *in vitro* a partir de tallos e hipocótilos cultivados *in vitro*, y tallos y yemas axilares provenientes de plántulas cultivadas en invernadero. Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 $g.L^{-1}$ de sacarosa y 3 $g.L^{-1}$ de phytagel, evaluando la combinación de dos auxinas: ANA y 2,4-D y dos citocininas: BAP y TDZ, bajo condiciones de temperatura entre 25-27 °C y 12 horas de fotoperiodo. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento con 3 explantes/frasco. De los explantes cultivados *in vitro,* se observó que el tratamiento constituido por 2,5 $mg.L^{-1}$ de BAP y 0,5 $mg.L^{-1}$ de ANA mostró el mayor porcentaje (62 %) de explantes con respuesta morfogénica. El mayor porcentaje de callos se presentó con 1 $mg.L^{-1}$ de BAP y 0,5 $mg.L^{-1}$ de ANA. Los hipocótilos fueron 100 % morfogénicos para todos los tratamientos. En los explantes provenientes de invernadero se encontró que los tratamientos constituidos por 3 $mg.L^{-1}$ de BAP y 0,5 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D y 0,5 - 1 $mg.L^{-1}$ de TDZ más 0,5 $mg.L^{-1}$ de 2,4-D mostraron una respuesta morfogénica en segmentos de tallo. En los brotes no hubo formación de raíces. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de iniciar un proceso de propagación de caoba vía embriogénesis somática debido a la formación de callos.
PALABRAS CLAVE: *in vitro*, morfogénico, explantes, brotes, hipocótilo, citocininas, auxinas.

ABSTRACT

Mahogany is highly valued especie for its listed wood; threatened by indiscriminate deforestation, severe attack of *Hypsipyla grandella* Zell and low seed viability. Therefore the establishment of a protocol for *in vitro* morphogenesis was raised from stems and hypocotyls cultivated *in vitro*, and stems and axillary buds from seedlings grown in greenhouses. The explants were cultured on Murashige and Skoog (1962), supplemented with sucrose 30 g.L-1 and 3 g.L-1 of phytagel, evaluating the combination of two auxins: ANA and 2,4-D and two cytokinins: BAP and TDZ, under temperature conditions between 25 to 27 ° C and 12 hour photoperiod. Ten repetitions per treatment with 3 explants / jar were established. From *in vitro* cultured explants was observed that treatment consisted of 2.5 $mg.L^{-1}$ BAP and 0.5 $mg.L^{-1}$ NAA showed the highest percentage (62 %) of explants with morphogenic response. Callus were submitted to MS media supplemented with 1 $mg.L^{-1}$ BAP and 0.5 $mg.L^{-1}$ NAA. Hypocotyls were 100 % morphogenic for all treatments. Morphogenic response was found in explants of stem segments coming from greenhouse under treatments consisting of 3 $mg.L^{-1}$ BAP and 0,5 $mg.L^{-1}$ 2,4-D; and 0.5 to 1 $mg.L^{-1}$ TDZ plus 0,5 $mg.L^{-1}$ 2,4-D. There was no root formation in shoots. The results open the possibility of initiating a process of propagation via somatic embryogenesis in mahogany due callus formation.
KEY WORDS: *in vitro*, morphogenic, explants, shoots, hypocotyl, cytokinines, auxins.

INTRODUCCIÓN

La caoba, es una especie forestal perteneciente a la familia de las Meliáceas, de gran importancia comercial, ya que su madera es muy fina y cotizada a nivel mundial, utilizada por la ebanistería de lujo. Sin embargo, la explotación de la madera es una de las amenazas que enfrenta la especie, así como también la destrucción del hábitat para el desarrollo de actividades urbanísticas y agropecuarias (Aymard *et al*., 2003). Otra de las causas que ha ocasionado la disminución de la población en su hábitat natural ha sido el ataque severo del barrenador de las Meliáceas, *Hypsipyla grandella Zell* (Lepidóptera, Pyralidae). Adicionalmente, esta especie presenta poca capacidad de regeneración debido a la baja viabilidad de la semilla, limitando su conservación y uso (CONIFOR, 2007).

En Venezuela no se cuenta con estudios sobre el estado actual de las poblaciones, pero se infiere una reducción considerable, sobre todo en la zona occidental del país. Es por ello, que el establecimiento de nuevas plantaciones forestales ayudaría a evitar que esta especie se extinga.

El cultivo de tejidos *in vitro* es una alternativa de gran relevancia para regenerar y multiplicar especies forestales que se encuentren en peligro de extinción como es el caso de la caoba. La ruta mayormente utilizada para la regeneración *in vitro* de especies arbóreas ha sido a través del alargamiento de brotes axilares, el cual consiste en cuatro pasos: **a)** Establecimiento del cultivo y/o inducción de brotes; **b)** Desarrollo y multiplicación, **c)** Enraizamiento y **d)** Aclimatación en vivero (Villalobos & Thorpe, 1991).

Medina (1995) al igual que Patiño (1997) señalan que la vía más idónea para la reproducción artificial de especies forestales que se encuentren en condición de extinción es a través de la micropropagación *in vitro*. Rodríguez (1999) reporta que esta técnica es factible de aplicar a corto plazo para el sector forestal y entre sus ventajas se encuentra la obtención de un gran número de plantas con características genéticas similares a la planta que le dio origen. Sin embargo, estos autores reportan que la mayor dificultad para el establecimiento de un protocolo de micropropagación, radica en la edad del cultivo, siendo este un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la propagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros (Mroginski *et al*., 2010).

Suárez *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo de micropropagación para plantas de roble (*Tabebuia rosea*), donde la mayor tasa de multiplicación se obtuvo mediante la aplicación de bencilaminopurina (BAP) al medio a una concentración de 4 $mg.L^{-1}$ y el mayor enraizamiento ocurrió en presencia de ácido naftalenacético (ANA) a razón de 1,2 $mg.L^{-1}$.

Por otro lado, Fonseca *et al*. (2006) reportan que la cantidad de callos observados en segmentos de epicótilo puede variar dependiendo de la combinación de los reguladores de crecimiento (ANA y BAP).

Por lo anteriormente señalado, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de morfogénesis *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King), comparando el efecto de la combinación de dos auxinas (ANA y 2,4–D) con dos citocininas (TDZ y BAP) a diferentes concentraciones, con la finalidad de producir una gran cantidad de plantas que permitan recuperar esta especie en peligro de extinción.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), ubicado en el Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay.

Se utilizaron como explantes segmentos de tallo de plantas jóvenes, de aproximadamente tres meses de germinadas, provenientes de invernaderos del estado Yaracuy y explantes de hipocótilo y segmentos de tallo de plántulas obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas recolectadas en las adyacencias del Instituto de Genética, Facultad de Agronomía. Las semillas fueron escarificadas manualmente previo a la siembra *in vitro*.

Una vez realizado la escarificación manual, las semillas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 70 % (3,5 % de ingrediente activo “i.a”) por 10 minutos en constante agitación, seguido de tres lavados con agua destilada estéril (ADE) y por último secadas con papel absorbente estéril. Para la germinación *in vitro* se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la fuerza iónica (1/2 MS).

La desinfección de los segmentos de tallo provenientes de invernadero fueron lavados con agua y jabón, luego colocados en una solución de benlate (5 ml.L^{-1}) por 30 minutos en constante agitación, en la cámara de flujo laminar se les realizó dos lavados con ADE y posteriormente fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 50 % (3,5 % i.a) por 20 minutos bajo constante agitación, seguido de tres lavados con ADE e inmediatamente secados con papel absorbente estéril.

Los tratamientos a utilizar para la micropropagación de ambos tipos de explantes estuvieron constituido por las sales básicas de MS (1962), suplementado con 30 g.L^{-1} de sacarosa con diferentes concentraciones de ácido α – naftalenacético (ANA): 2,4 diclofenoxiacético (2,4–D): bencilamino purina (BAP) y tidiazuron (TDZ) (Cuadro 1), solidificado con 3 g.L^{-1}de phytagel y pH de 5,8 ± 0,2.

Para el enraizamiento de los brotes, se utilizó las sales básica de MS suplementado con 0,5 mg.L^{-1} de Ácido indol butírico (AIB).

SIEMBRA DE EXPLANTES PROVENIENTES DE INVERNADERO

Una vez realizada la desinfección de los explantes, se cortaron segmentos de tallo de aproximadamente 2 cm, los cuales fueron implantados en los diferentes tratamientos a razón de 2 – 3 segmentos por frascos, posteriormente tapados y sellados con parafilm y llevados al cuarto de crecimiento a una temperatura entre 25 – 27 °C y 12 horas de fotoperíodo.

SIEMBRA DE EXPLANTES PROVENIENTES DE PLANTAS IN VITRO

Se utilizaron como explante segmentos de tallo de aproximadamente 2 cm de longitud, colocándose de dos a tres explantes por frasco de medio para cada tratamiento. Los frascos fueron llevados al cuarto de crecimiento a una temperatura entre 25 – 27 °C y 12 horas de fotoperiodo.

El ensayo fue establecido bajo un diseño experimental completamente aleatorizado con 10 tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento y tres explantes por frasco. En donde la unidad experimental estuvo constituida por un frasco.

CUADRO 1. Tratamientos empleados para inducir la morfogénesis en caoba.

TRATAMIENTOS	REGULADOR DE CRECIMIENTO (MG/L)			
	BAP	ANA	2,4-D	TDZ
T1	1	0,5		
T2	2	0,5		
T3	2,5	0,5		
T4	3	0,5		
T5	1		0,5	
T6	2		0,5	
T7	2,5		0,5	
T8	3		0,5	
T9			0,5	0,5
T10			0,5	1

Las variables evaluadas fueron porcentaje (%) de explantes con brotes y/o raíces y porcentaje (%) de explantes con callos. Adicionalmente se consideraron los porcentajes de contaminación observados en los tratamientos evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE DE INDUCCIÓN MORFOGÉNICA DE EXPLANTES CULTIVADOS IN VITRO

En el **CUADRO 2** se puede evidenciar que en los tratamientos 1 y 3 (1mg.L^{-1} BAP + 0,5 mg.L^{-1}ANA) y (2,5 mg.L^{-1} BAP + 0,5 mg.L^{-1} ANA) respectivamente, mostraron el mayor porcentaje (61 y 62 %) de emergencia de las yemas *[FIGURA 1A]*, resultados similares fueron reportados por Tacaronte *et al.* (2004) al utilizar los mismos reguladores de crecimiento pero a diferentes concentraciones en porciones de tallo de caoba, señalando que los vástagos más vigorosos se obtuvieron en aquellos tratamientos que contenían baja concentración de 6-BAP en ausencia de ANA.

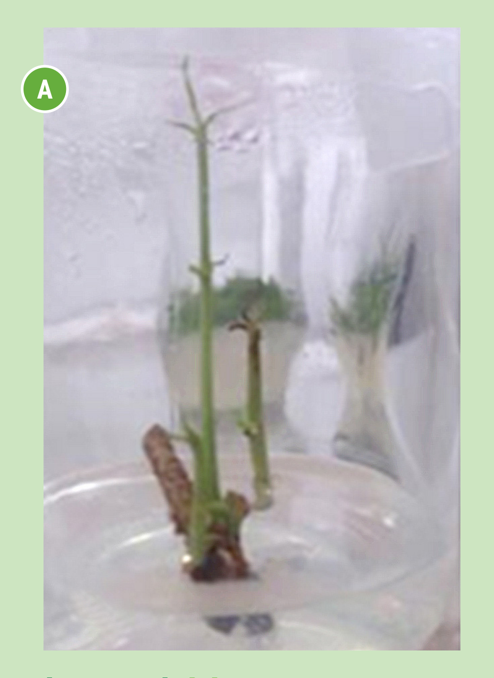
Paladinez (2011) reportó para el cedro que el mayor número de brotes/entrenudo y porcentaje de supervivencia se obtuvieron en explantes cultivados a 0,5 mg.L^{-1} BAP, a diferencia de Collado *et al.* (2004) quienes lograron el establecimiento de vástagos vigorosos de caoba a una concentración de 0,2 mg.L^{-1} 6-BAP utilizando para ello segmentos nodales. .

Es importante mencionar que todos los explantes de hipocótilos sembrados *in vitro* fueron 100% morfogénicos *[CUADRO 2]*, con un promedio de 2 brotes/hipocótilos *[FIGURA 1B]*; sin embargo, el mayor número de brotes (1,5) resultantes de tallos se obtuvo en los tratamientos 1 (1mg.L^{-1} BAP + 0,5 mg.L^{-1} ANA) y 4 (3mg.L^{-1} BAP + 0,5 mg.L^{-1} ANA). Estos resultados difieren de los reportados por Flores (2001) quien obtuvo un promedio de 2,33 brotes/explante utilizando una menor concentración de BAP (0,5 mg.L^{-1}), la cual puede estar asociada con una respuesta genotípica, con el explante y las condiciones de desarrollo de la planta madre. Se ha reportado que los requerimientos

CUADRO 2. Respuesta morfogénica de explantes de caoba cultivados *in vitro*.

Trat.	% TM	% HM	PB/T	PB/H	% CF	% C	% S/R
1	61	100	1,5	2	18	14	7,0
2	40	100	1,0	2	0	44	16
3	62	100	1,3	2	4	19	16
4	33	100	1,5	2	0	56	11
5	38	100	1,4	2	0	46	16
6	43	100	1,0	2	0	43	14
7	33	100	0,8	2	0	56	11
8	0,0	100	0,0	2	0	100	0,0
9	0,0	100	0,0	2	0	100	0,0
10	0,0	0,0	0,0	0	0	100	0,0

TM: porcentaje de tallos morfogénicos; **HM**: porcentaje de hipocótilos morfogénicos; **PB/T**: promedio brotes/tallo; **PB/H**: promedio de brotes/hipocótilo; **CF**: porcentaje de callos formados, **C**: porcentaje de contaminación, **S/R**: porcentaje de explantes sin respuesta.





[FIGURA 1] [A] Porciones de tallo con presencia de dos brotes o yemas, [B] hipocótilo con brote.

de citocinina en las plantas cultivadas *in vitro* son extremadamente variables ya que estos reguladores tienen un efecto fisiológico importante durante el proceso de desarrollo de brotes, además las respuestas a la inducción de brotes dependen del contenido endógeno requerido por la especie y por el tipo de explante utilizado, es por ello que el comportamiento de los explantes en la fase de multiplicación *in vitro* requieren de un adecuado balance endógeno de reguladores de crecimiento para así inducir la división y el alargamiento celular (Carranza *et al*. 2013; Mona 2012; Collado *et al*. 2004).

FORMACIÓN DE CALLOS EN EXPLANTES CULTIVADOS IN VITRO

El mayor porcentaje de callos (18 %) se presentó en el tratamiento 1 *[CUADRO 2]* y esta respuesta está asociada con el tipo de auxina y a la relación auxina y citocininas presente en el medio, lo que demuestra el efecto callogénicos de ANA en explantes de caoba. Cabe destacar que estos callos fueron obtenidos a partir de explantes de tallos. Estos resultados coinciden con los reportados por Fonseca *et al.* (2006) quienes señalan que alcanzaron un 100 % de formación de callos en los explantes al usar las mismas concentraciones de los reguladores de crecimiento.

Se debe resaltar que los tratamientos (T1 y T3) que presentaron el mayor porcentaje de callos, coinciden con la mayor formación de brotes por segmento de tallo cultivados *in vitro*; sin embargo, se evidenció que una relación auxina citocinina (A/C) cercano a 1 estimula positivamente la formación de brotes, estos resultados coinciden con los reportados por Tacoronte *et al*. (2004) quienes señalan que la mejor inducción y formación de brotes se consigue en un rango de concentración comprendido entre 0 – 0,44 mgl^{-1} de ANA y entre 0-2,56 mgl^{-1} de BA. Adicionalmente estos resultados callogénicos abren la posibilidad de iniciar un proceso de propagación de caoba vía embriogénesis somática.

El porcentaje de contaminación observado en los explantes provenientes de condiciones *in vitro* fue de 100 % para los tratamientos 8, 9 y 10; mientras que en los tratamientos 2, 4, 5 y 7 estuvo alrededor del 50 % y en los tratamientos 1 y 3 se observó el menor porcentaje (14-19 %) de ataque por patógenos (hongos y bacterias). Estos resultados de contaminación están asociados con la procedencia de la semilla y condiciones de almacenamiento de las mismas. Por último, se observaron explantes sin ninguna respuesta morfogénica *[CUADRO 2]*, esto pudiera estar relacionado con condiciones intrínsecas de la especie y con la relación auxina/citocinina presente en el medio de cultivo, lo cual ha sido previamente reportado por Fonseca *et al*. (2006) y Tacoronte *et al*. (2004).

FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES PROVENIENTES DE INVERNADERO

Los tratamientos T8 (3 mg.L-1 BAP + 0,5 mg.L-1 2,4-D), T9 (0,5 mg.L-1 TDZ + 0,5 mg.L-1 2,4-D) y T10 (1 mg.L-1TDZ + 0,5 mg.L-1 2,4 –D) mostraron una respuesta morfogénica en los segmentos de tallo, evidenciándose más del 50 % de inducción de callos en esos tratamientos. Daquinta *et al*. (2002) reportan que a medida que se incrementa las concentraciones de TDZ en el medio de cultivo se incrementa la formación de callos en ápices foliares y entrenudos de teca; este grupo además reportó que a menor

concentración de TDZ los callos adoptan un aspecto nodular de color verde y apariencia compacta, diferencia de lo encontrado por nuestro grupo de investigación donde los callos fueron de apariencia friable, inicialmente de color blanco y al cabo de los días se tornaron marrón oscuro *[CUADRO 3]*. No obstante, no se evidenció la formación de embriones. Resultados similares fueron reportados por Jácome (2012) al evaluar los mismos reguladores de crecimiento (2,4-D, TDZ y BAP) en romerillo (*Podocarpus oleifolius*) pero a diferentes concentraciones y utilizando meristemas apicales como explante.

El TDZ es una citocinina de amplia actividad morfogénica en tejidos de plantas maderables la cual puede inducir diversos tipos de respuestas desde la inducción de callos hasta la formación de embriones somáticos, ya que este citocinina puede actuar a través de la modulación de los reguladores de crecimiento endógenos. (Daquinta *et al*. 2002; Murphy *et al*., 1998)

Se determinó un alto porcentaje de contaminación. Estos problemas de contaminación estuvieron asociados posiblemente al inadecuado manejo que se les dio a las plantas madres y a los cambios bruscos de temperatura. Biasi *et al*. (1994) señalaron que la presencia de microorganismos contaminantes, tales como hongos y bacterias son uno de los elementos que pueden limitar el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas leñosas.

ENRAIZAMIENTO DE BROTES OBTENIDOS IN VITRO

Los brotes provenientes de explantes cultivados *in vitro* no se observó respuesta en el medio de inducción de raíces. Sin embargo, Rodríguez (1999) lograron con este mismo regulador y concentración la inducción de raíces; lo cual puede estar asociado con las condiciones intrínsecas de la especie.

CUADRO 3. Respuesta morfogénica de explantes (segmentos de tallos) de caoba cultivadas en invernadero.

TRAT.	%TM	PB/T	PB/H	% CF	% C
1	0	0	0	0	100
2	0	0	0	0	100
3	0	0	0	0	100
4	0	0	0	0	100
5	0	0	0	0	100
6	0	0	0	0	100
7	0	0	0	0	100
8	50	0	0	50	50
9	57	0	0	57	43
10	50	0	0	50	50

TM: porcentaje de tallos morfogénicos; **PB/T**: promedio brotes/tallo;
PB/H: promedio de brotes/hipocótilo; **CF**: porcentaje de callos formados, **C**: porcentaje de contaminación.

CONCLUSIONES

Se pudo evidenciar que el BAP a concentraciones de 1 y 2,5 mg.L^{-1} en combinación con el ANA a razón 0,5 mg.L^{-1} fue la que mejor favoreció el desarrollo de brotes de los explantes cultivados *in vitro*. Observándose un 100 % de morfogénesis en todos los explantes de hipocótilos sembrados, con un promedio de 2 brotes/ hipocótilo.

El tratamiento con 1 mg.L^{-1} BA y 0.5 mg.L^{-1} ANA fue el que mostro la mayor respuesta callogénica en los explantes cultivados; sin embargo al evaluar el origen del explante (invernadero o material sembrado *in vitro*), se evidencio que aquellos provenientes de plantas sembradas en invernadero respondieron con un 50 % de inducción de callo para los tratamientos que contenían BAP (3 mg.L^{-1}) y TDZ (0,5 y 1 mg.L^{-1}) en combinación con ANA (0,5 mg.L^{-1}), esto se presume está asociado con la condición fisiológica de las plantas madres.

Los problemas de contaminación estuvieron asociados con las condiciones de conservación de las semillas utilizadas tanto para la siembra *in vitro* como en invernadero, por lo que se recomienda evaluar un mejor protocolo de desinfección de las semillas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aymard, G; Guevara, J; Magallanes, A; Ortiz, R. & Rodríguez, L. 2003. *Libro Rojo de la Flora Venezolana*. Primera edición. Caracas, Venezuela. 255 p.

Biasi, L.; Koller, O. & Kämpt, A. 1994. Micropropagacäo do abacateiro Ouro verde apartir de segmentos nodais. *Pesq. Agrop. Brazill.* 29: 1051-1058

Carranza P., M.; Reyes M., H.; Mora S., W.; Cevallos F., O.; Escobar T., A.; Cadme A., M.; Nieto R., J. & Morante C., J. 2013. Propagación clonal *in vitro* de Swietenia macrophylla King (CAOBA). *Ciencia y Tecnología* 6(2): 1-8.

Collado, R.; Bardon R.; Agramonte D.; Jiménez F.; Pérez M.; Gutiérrez O. & Ramírez D. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Switenia macrophylla King*. *Biotecnología vegetal.* Vol. 4 N° 3: 143-146.

CONIFOR. 2007. Propuesta Nacional para el manejo sostenible de la *Switenia macrophylla King* “Caoba” en Ecuador. Colegio de Ingenieros forestales. 12 p.

Daquinta M.; Ramos L.; Capote, I.; Lezcano, Y.; Rodríguez, R. & Escalona M. 2002. Morfogénesis *in vitro* de Teca (*Tectona grandis* L.). *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* Vol. 11 (1): 137-144.

Flores, A. 2001. *Establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación de caoba* (*Swietenia macrophylla* King.) *a partir de microestacas tomadas de plantas de invernadero*. Tesis para optar al Título de *Magister Scientiarum*. Turrialba, Costa Rica, CATIE.

Fonseca, J.; Campos, W.; Pinheiro, A. & Fonseca, E. 2006. *Revista Ciencia Forestal* 71: 19-24. Brasil.

Jácome, J. 2012. Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de las especies en el Distrito Metropolitano de Quito. Tesis de pregrado. Sangolqui. 112 p.

Medina M. 1995. Metodología para el establecimiento de tejidos vegetales procedentes de árboles de *Swietenia macrophylla x S. mahagoni* para técnicas de propagación. Fórum de Ciencia & Técnica, Univ. De P. Río. 7 p.

Mona, A. Amin. 2012. In Vitro Propagation of Swietenia macrophylla King. Research *Journal of Agriculture and Biological Sciences* 8(2): 282-287.

Mroginski, L.; Sansberro, P.; & Flaschland, E. 2010. Capítulo I: Establecimiento del cultivos de tejidos vegetales. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp y Mroginski L (eds). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Vol 2. pp. 17-25 ArgenBio. Argentina.

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and biossays of tobacco cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.

Murthy B.N.S.; Murch S.J. & Saxena P.K.; 1998. Thiadiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 34, 267-275.

Paladinez, E. 2011. *Desarrollo de un protocolo de propagación in vitro para cedro* (*Cedrela odorata* L). Tesis de Grado. Universidad Técnica Estadal de Quevedo. Quevedo, Ecuador.

Patiño, F. 1997. *Recursos genéticos de Swetenia & Cedrela en los neotrópicos: Propuesta para acciones coordinadas*. FAO, Italia. 58 p.

Rodríguez, R. 1999. Bases fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal. Libro de reportes cortos. En: IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 9-13.

Suárez I.; Jarma A. & Ávila M. 2006. *Desarrollo de un protocola para la propagación in vitro de Roble* (*Tabebuia rusea* Bertol DC). Vol. 11: (2) pp. (52-62). Colombia.

Tacaronte, M.; Vielma M.; Valecillos, C. & Mora, A. 2004. Propagación in vitro de caoba (Swietenia macrophylla King) a partir de yemas axilares. *ACV.* 55(1): 7-12.

Villalobos, V. & Thorpe T. 1991.Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* (Ed.): Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, pp. 128-141.